

产品简介

ATGScript® U⁺ One Step RT-qPCR Probe Kit 专为以 RNA 为模板（如 RNA 病毒）的定量 PCR 检测而设计，使用基因特异性引物（GSP），逆转录和 qPCR 反应在一管内完成，不需要额外的开管移液操作，大大提高了检测通量，并降低了污染的风险。本试剂盒中引入了 dUTP/UDG 防污染系。热敏感（Heat-labile）UDG 在室温下即可将含 U 的污染物速解；55 °C 逆转录时，Heat-labile UDG 迅速失活，不会影响 RT-qPCR 的效率和灵敏度。整合 ATGScript® Reverse Transcriptase 以及热启动的 ATGStart® Taq DNA Polymerase 的优越性能，配合经过优化的缓冲体系，ATGScript® U⁺ One Step RT-qPCR Probe Kit 的检测灵敏度可达到 0.1 pg 总 RNA 或 <10 拷贝的 RNA 模板。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供。2 × one Step U⁺ Mix 包含优化的缓冲体系和 dNTP / dUTP Mix，适用于 TaqMan 等荧光标记探针的高特异性检测系统。

产品组分

组分	250rxn (20µl/rxn)
RNase free ddH ₂ O	2 × 1.25 ml
2 × U ⁺ Probe One-Step Reaction Mix ^a	2 × 1.25 ml
RTq U ⁺ Enzyme Mix ^b	250 µl
50 × ROX Reference Dye1 ^c (可选)	100 µl
50 × ROX Reference Dye2 ^c (可选)	100 µl

a. 包含 dNTP/dUTP Mix, Mg²⁺

b. ATGScript™ Reverse Transcriptase、RNasin、UDG 酶以及热启动的 ATGStart™ Taq DNA Polymerase。

c. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，使用 ABI7900HT/7300Real-Time PCR System 和 Step One Plus 时使用 50 × ROX Reference Dye 1；ABI7500, 7500Fast Real-time PCR System, Stratagene Mx3000P 使用 50 × ROX Reference Dye2；Roche, Bio-Rad 的 Real Time PCR 仪不必使用 ROX。

保存条件

20°C保存

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶及 RNase 残留。

功能测试：以 HeLa 细胞总 RNA 为模板，1 pg–1 ug 起始量中的 4 个浓度梯度，扩增三个不同丰度基因扩增效率在 0.9-1.1 之间，且模板量为 1 pg 时 B2M 基因的 CT 值在 35 以内。

注意事项

- One Step RTq U⁺ Enzyme Mix 含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部并用移液枪轻轻吸打，充分混匀后准确吸取。
- 反应液的配制请使用 RNase-free 枪头 EP 管等，尽量避免污染。

实验流程

1. 在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

RNase free ddH ₂ O	to 20 μ l
2 \times U ⁺ Probe One-Step Reaction Mix	10 μ l
RTq U ⁺ Enzyme Mix	1 μ l
50 \times ROX Reference Dye 1	0.4 μ l
Gene Specific Primer Forward (10 μ M)	0.4 μ l
Gene Specific Primer Reverse(10 μ M)	0.4 μ l
TaqMan Probe (10 μ M)	0.2 μ l
模板 RNA	Total RNA: 1 pg-1 μ g

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整:

▲一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μ M 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时,可以在 0.1-1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

▲探针终浓度可以在 50 nM-250 nM 之间调整。

▲PCR 灵敏度极高建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后(如稀释至 25 μ l/样本)加入反应体系中,这样可以有效提高实验的重复性。

▲扩增产物长度请选择在 80 bp-200 bp 范围内

2. 按下列条件进行 One Step qRT-PCR 反应

标准程序(可获得最高的扩增灵敏度)

Stage 1	逆转录	Reps: 1	55 $^{\circ}$ C	15 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95 $^{\circ}$ C	8 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95 $^{\circ}$ C	10 sec
			60 $^{\circ}$ C	30 sec

快速程序(可满足大部分应用)

Stage 1	逆转录	Reps: 1	55 $^{\circ}$ C	5 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95 $^{\circ}$ C	30 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95 $^{\circ}$ C	5 sec
			60 $^{\circ}$ C	20 sec

a.对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板,将逆转录温度提高到 55 $^{\circ}$ C,有助于提高扩增效率和灵敏度。

b.延伸时间请根据您使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整:使用 ABI 7700 和 7900HT 时至少 30 秒;使用 ABI 7000 和 7300 时至少 31 秒;使用 ABI 7500 时至少 34 秒。

c.实际使 Real Time PCR 仪是否支持快速扩增循环,初次尝试请进行预实验确认。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线,进行标准曲线制作等。